

Anna Pasięka
Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku
Katedra Chemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny UJ CM

Aryloalkilowe pochodne alkanoloamin jako inhibitory butyrylocholinoesterazy i beta-sekretazy o potencjalnej aktywności w chorobie Alzheimera

Streszczenie

Choroba Alzheimera jest postępującą i śmiertelną chorobą neurodegeneracyjną o złożonym patomechanizmie, która dotyka milionów osób na całym świecie. Niestety, brak skutecznej metody leczenia uniemożliwia pomoc pacjentom i tym samym, choroba ta staje się poważnym problemem zdrowotnym, społecznym i ekonomicznym. W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto badania, które mogą przyczynić się do znalezienia skutecznej terapii choroby Alzheimera.

We wstępie pracy przedstawiono epidemiologię oraz złożoną etiologię choroby, a także wyniki badań dotyczących poszukiwania nowych leków. Skupiono się przede wszystkim na złożonej terapii, a dokładnie na strategii ligandów wielofunkcyjnych, która wydaje się być dedykowanym rozwiązaniem w leczeniu choroby Alzheimera.

Celem podjętych badań była synteza i ocena aktywności biologicznej nowych ligandów wielofunkcyjnych w grupie pochodnych hydroksyetylenoaminowych ukierunkowanych na przyczynowe i objawowe cele biologiczne (β -sekretaza, cholinoesterazy, transportery GABA) oraz procesy (agregacja β -amyloidu i białka tau) odpowiedzialne za etiopatogenezę choroby Alzheimera. Wszystkie mają istotne znaczenie z punktu widzenia procesów neurodegeneracyjnych towarzyszących chorobie Alzheimera, a jednoczesny wpływ na nie może podnieść efektywność terapii.

Prowadzone w toku pracy badania miały charakter interdyscyplinarny i zostały podzielone na dwie części. Pierwsza, zasadnicza część badań własnych, obejmowała projektowanie, syntezę chemiczną, badania biologiczne *in vitro*, szczegółową analizę zależności struktura – aktywność oraz dodatkowe, poszerzone badania dla wybranych związków. Druga część obejmowała ocenę właściwości antyagregacyjnych *in cellulo* przy użyciu rekombinowanych bakterii *Escherichia coli*.

Jako punkt początkowy podczas projektowania nowych związków, wybrano strukturę liganda wielofunkcyjnego, uprzednio otrzymanego w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku, o zbalansowanych aktywnościach hamujących butyrylocholinoesterazę (BuChE), β -sekretazę (BACE-1) oraz agregację białka tau i β -amyloidu. Zaproponowano szereg modyfikacji, których celem była poprawa aktywności wobec wybranych celów biologicznych oraz stopniowa optymalizacja właściwości fizykochemicznych otrzymywanych związków. W wyniku kilkuetapowej syntezy chemicznej otrzymano łącznie 96 związków, dla których potwierdzono czystość i tożsamość metodami spektroskopowymi.

Wykonane badania biologiczne *in vitro* wykazały, że wprowadzone modyfikacje poprawiły aktywność biologiczną nowych cząsteczek wobec wybranych celów molekularnych, co potwierdziło zasadność przeprowadzonych zmian. Wśród zsyntetyzowanych pochodnych zidentyfikowano ligandy wielofunkcyjne o zbalansowanym profilu działania. Na uwagę zasługują związki: **60** oraz *(R,S)*-**108**. Pierwszy z nich, związek **60** poprzez wpływ na transmisję cholinergiczną i GABAergiczną oraz agregację β -amyloidu może potencjalnie modyfikować zarówno przyczyny, jak i objawy choroby (*ee*AChE IC₅₀ = 2,86 μ M; *eq*BuChE IC₅₀ = 59 nM; *h*BuChE IC₅₀ = 23 nM; *h*BACE-1 IC₅₀ = 5,9 μ M; hamowanie agregacji A β = 57,9% (przy 10 μ M); *m*GAT1 IC₅₀ = 10,96 μ M i *m*GAT2 IC₅₀ = 19,05 μ M). Taki złożony mechanizm działania, który nigdy wcześniej nie został opisany, czyni tę cząsteczkę wyjątkową i oryginalną.

Najistotniejszym osiągnięciem pracy doktorskiej jest otrzymanie cyklopropylowej pochodnej *(R,S)*-**108** o dualnym cholinergicznym-GABAergicznym działaniu (*eq*BuChE IC₅₀ = 0,313 μ M, *h*BuChE IC₅₀ = 0,207 μ M, *m*GAT1 IC₅₀ = 10,96 μ M, *m*GAT2 IC₅₀ = 10,72 μ M, *m*GAT3 IC₅₀ = 7,41 μ M, *m*GAT4 IC₅₀ = 7,76 μ M) oraz zdolności hamowania agregacji β -amyloidu (79% w 10 μ M). Z racji swojego unikalnego profilu biologicznego, korzystnych właściwości ADME-tox oraz spełniania reguły lekopodobności została ona wyselekcjonowana do badań *in vivo*. Wyniki badań farmakokinetycznych oraz toksykologicznych, potwierdziły, że związek *(R,S)*-**108** jest bezpieczny w dawce 10 mg/kg, przenika przez barierę krew-mózg oraz ma optymalny profil farmakokinetyczny. Z kolei wykonane testy farmakologiczne *in vivo* potwierdziły, że *(R,S)*-**108** poprawia pamięć w teście biernego unikania oraz ma pozytywny wpływ na pamięć długotrwałą w teście labiryntu Barnes'a. Aktualnie cząsteczka *(R,S)*-**108** uzyskała ochronę patentową, a prace nad jej rozwojem są kontynuowane.

Co równie cenne, otrzymano także silne, wysoce selektywne inhibitory działające tylko na jeden cel biologiczny, wykraczając poza przyjęte założenia pracy. Takim przykładem są m.in. silne, selektywne inhibitory BuChE **40** i **39** (*h*BuChE IC₅₀ = 68 nM, IC₅₀ = 207 nM, odpowiednio) o korzystnych właściwościach fizykochemicznych i profilu bezpieczeństwa. Z kolei, związek *(S,S)*-**55**, jest selektywnym inhibitorem podtypu 3 transportera kwasu γ -aminomasłowego (*m*GAT4 IC₅₀ = 5,01 μ M; *h*GAT3 IC₅₀ = 2,95 μ M) – jest to obecnie najsilniejszy opisany w literaturze inhibitor *h*GAT3 o tak wysokiej selektywności wobec innych podtypów.

Część druga badań własnych objęła ocenę właściwości antyagregacyjnych *in cellulo* przy użyciu rekombinowanych bakterii *Escherichia coli* z nadekspresją określonego białka (tau, β -amyloid) dla wcześniej otrzymanej biblioteki 24 związków. Uzyskane wyniki pozwoliły zidentyfikować silne, dualne inhibitory agregacji z najaktywniejszym **129** (ham. agr. A β ₄₂ 80,0%, białka tau – 68,3% w stężeniu 10 μ M) oraz poszerzyć wiedzę na temat optymalnej budowy związków potrzebnej do silnego hamowania procesu agregacji, a także mogą służyć jako ważny punkt wyjścia dla dalszych badań nad poszukiwaniem inhibitorów/modulatorów procesów agregacji β -amyloidu i białka tau.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and fatal neurodegenerative disease with a complex pathomechanism affecting millions of people worldwide. Unfortunately, the lack of an effective treatment makes it impossible to help patients, and thus AD can be considered as a serious health, social and economic problem. This doctoral dissertation presents interdisciplinary research focused on searching for new anti-AD agents.

The introduction describes the epidemiology and the complex etiology of the disease, as well as the results of the latest research on the search for new drugs. I focused mainly on the multifunctional ligand strategy, which seems to be a promising solution in the treatment of Alzheimer's disease.

The general objective of the research assumed synthesis and biological evaluation of novel multifunctional ligands in the group of hydroxyethyleneamine derivatives targeting causal and symptomatic biological targets (β -secretase, cholinesterases, GABA transporters) and processes (β -amyloid and tau protein aggregation) responsible for pathogenesis of AD. All of them are pharmacologically relevant to AD, and the synergistic effect on their inhibition may increase the effectiveness of the therapy.

The presented research are divided into two parts. The first, fundamental part of the thesis, includes design, chemical synthesis, biological evaluation *in vitro*, analysis of the structure-activity relationship, and additional, extended studies for interesting compounds. The second part includes the *in cellulo* assessment of anti-aggregation properties using recombinant *Escherichia coli* bacteria.

As a starting point for the design of new compounds, I selected a multifunctional ligand, previously synthesized at the Department of Physicochemical Drug Analysis, with balanced activities towards the inhibition of butyrylcholinesterase (BuChE), β -secretase (BACE-1) and aggregation of tau and β -amyloid proteins. I introduced several modifications to improve the biological activity and to optimize the physicochemical properties of new compounds. As a result of multiple step synthesis, 96 compounds were obtained and characterized by spectroscopic methods.

The *in vitro* biological data showed that the implemented modifications were rational and improved the biological activity of the new molecules against selected molecular targets. Among all obtained derivatives, some interesting multifunctional ligands with a balanced profile of action were identified. Two of them: compounds **60** and (*R,S*)-**108** are worth mentioning. The first one, compound **60**, by affecting cholinergic and GABAergic transmission and β -amyloid aggregation, can potentially modify both the causes and symptoms of the disease (*ee*AChE $IC_{50} = 2.86 \mu\text{M}$; *eq*BuChE $IC_{50} = 59 \text{ nM}$; *h*BuChE $IC_{50} = 23 \text{ nM}$; *h*BACE-1 $IC_{50} = 5.9 \mu\text{M}$; inhibition of A β aggregation = 57.9% (at 10 μM); *m*GAT1 $IC_{50} = 10.96 \mu\text{M}$ and *m*GAT2 $IC_{50} = 19.05 \mu\text{M}$). This complex mechanism of action, which has never been reported before, makes this molecule unique and original.

The crucial achievement of this doctoral dissertation is the cyclopropyl derivative (*R,S*)-**108** with a dual cholinergic-GABAergic effect (*eq*BuChE $IC_{50} = 0.313 \mu\text{M}$, *h*BuChE $IC_{50} = 0.207 \mu\text{M}$, *m*GAT1 $IC_{50} = 10.96 \mu\text{M}$, *m*GAT2 $IC_{50} = 10.72 \mu\text{M}$, *m*GAT3 $IC_{50} = 7.41 \mu\text{M}$, *m*GAT4 $IC_{50} = 7.76 \mu\text{M}$) and β -amyloid aggregation inhibitory property (79% in 10 μM). Due to its unique biological profile, beneficial ADME-tox properties and

compliance with well-known drug-like rules, it was selected for *in vivo* tests. First, the pharmacokinetic and toxicological studies confirmed that the compound (*R,S*)-**108** is safe at a dose of 10 mg/kg, crosses the blood-brain barrier and demonstrates an optimal pharmacokinetic profile. Next, *in vivo* pharmacological tests suggested that (*R,S*)-**108** improves memory in the passive avoidance test and has a positive effect on long-term memory in the Barnes maze test. Currently, the (*R,S*)-**108** molecule is the subject of the patent application, and the research on its development is continued.

Additionally, beyond the main aim of the thesis, we also found strong, highly selective inhibitors affecting only one biological target. Such an example are **40** and **39** - potent, selective inhibitors of BuChE (*h*BuChE $IC_{50} = 68$ nM, $IC_{50} = 207$ nM, respectively) with drug-like physicochemical properties and a safety profile. In turn, the compound (*S,S*)-**55** is a selective inhibitor of the subtype 3 of the γ -aminobutyric acid transporter (*m*GAT4 $IC_{50} = 5.01$ μ M; *h*GAT3 $IC_{50} = 2.95$ μ M); to the best of my knowledge, it is the most potent inhibitor of *h*GAT3 with such high selectivity against other subtypes up-to-date.

The second part presents the *in cellulo* assessment of anti-aggregation properties using recombinant *Escherichia coli* bacteria overexpressing a relevant protein (tau, β -amyloid) for a previously reported library of 24 compounds. The obtained data allowed to identify strong, dual aggregation inhibitors with the most active derivative **129** (agr. $A\beta_{42}$ 80.0%, tau proteins - 68.3% at a concentration of 10 μ M) and to broaden the knowledge about the structural requirements for the inhibition of $A\beta$ vs tau. These results can also serve as a good starting point for further research either on $A\beta$ and tau aggregation processes or on their inhibitors/modulators.